

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL XIV – MICROBIOLOGIE

PUȘCAȘU MARIA



TEZĂ DE DOCTORAT

FACTORI DE RISC PENTRU DOBÂNDIREA INFECȚIILOR
CU GERMEI DIN GRUPUL *PROTEUS* ÎN SECȚIILE DE
TERAPIE INTENSIVĂ ȘI CU PROFIL CHIRURGICAL

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. LICKER MONICA

Timișoara
2022

CUPRINS

Listă lucrări	VI
Listă abrevieri	VII
Listă tabele	IX
Listă figuri	X
Dedicații	XII
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE.....	XV

PARTEA GENERALĂ

1. GRUPUL <i>PROTEEEAE</i>	1
1.1. Caracterizare generală	1
1.2. Genul <i>Proteus</i>	3
1.3. Genul <i>Morganella</i>	4
1.4. Genul <i>Providencia</i>	6
2. MECANISME DE REZISTENȚĂ	8
2.1. Considerații generale	8
2.2. Rezistența la carbapeneme	10
2.2.1. Carbapeneme- generalități	10
2.2.2. Mecanisme de rezistență la carbapeneme.....	12
2.2.2.1. Non-Metallo-Carbapenemases: Zinc-Independent.....	14
2.2.2.2. Metallo-Carbapenemases: Zinc-Dependent Class B.....	17
2.3. Metode de detectare a carbapenemazelor	18
2.3.1. Testarea sensibilității la carbapeneme	19
2.3.2. Medii de cultură cromogene – Generalități.....	22
2.3.2.1. Medii cromogene pentru izolarea specifică a patogenilor	22
2.3.2.2. Medii cromogene pentru detecția germenilor producători de carbapenemază	23
2.3.3. Testul Hodge modificat	25
2.3.4 Testul enzimatic CarbaNP	25
2.3.5. Maldi TOF	26
2.3.6. Studiul sinergiei carbapenemelor cu diverse substanțe	27
2.3.7. Metode moleculare	28
3. FACTORII PREDICTORI PENTRU INFECȚIILE DIN TERAPIE INTENSIVĂ ȘI SECȚIILE CU PROFIL CHIRURGICAL.....	30
3.1. IAAM- Generalități	30
3.2. Factorii de risc predispozanți asociați infecției dobândite în Terapie Intensivă.....	32

3.3. Factorii de risc predispozanți asociați infecției dobândite în secțiile chirurgicale	34
--	----

PARTEA SPECIALĂ

4. MATERIAL ȘI METODĂ.....	37
4.1. Scop	37
4.2. Obiective	38
4.3. Metodologie generală	38
4.4. Metoda microbiologică	41
4.4.1. Recoltarea produselor patogene.....	42
4.4.2. Izolarea germenilor	42
4.4.3. Identificarea	43
4.4.4. Testarea sensibilității la antimicrobiene.....	47
4.4.5. Analiza statistică	48
5. ETAPELE CERCETĂRII	49
5.1. Diseminarea tulpinilor de <i>Proteae</i> producătoare de carbapenemaze	49
5.1.1. Introducere	49
5.1.2. Scop/Obiective	50
5.1.3. Material și metodă	51
5.1.3.1. Detectarea fenotipică a carbapenemazelor	51
5.1.3.2. Identificarea genelor de rezistență prin metoda Polymerase chain reaction.....	53
5.1.4. Rezultate	58
5.1.4.1. Lotul studiat	58
5.1.4.2. Confirmarea fenotipică	62
5.1.4.3. Confirmarea genetică.....	64
5.1.5. Discuții	67
5.1.6. Concluzii parțiale	72
5.2. Evoluția prevalenței izolatelor <i>Proteae</i> -dtr în produsele biologice	72
5.2.1. Introducere	72
5.2.2. Scop/Obiective	73
5.2.3. Material și metodă	74
5.2.3.1. Încadrarea în fenotipuri de rezistență	74
5.2.3.2. Analiza statistică	74
5.2.4. Rezultate	75
5.2.5. Discuții	84
5.2.6. Concluzii parțiale	87
5.3. Impactul clinic al tulpinilor <i>P. stuartii</i> și <i>P. mirabilis</i> în rândul pacienților diabetici.....	88
5.3.1. Introducere	88

5.3.2. Scop/Obiective	90
5.3.3. Material și metodă	91
5.3.4. Rezultate	92
5.3.5. Discuții	96
5.3.6. Concluzii parțiale	104
6. CONCLUZII GENERALE	106
7. ORIGINALITATEA TEZEI	108
BIBLIOGRAFIE	109

Cuvinte cheie: *Proteae*-carbapenem rezistente, Terapie Intensivă, *P. stuartii*, diabet, non-diabet, secții chirurgicale, fatalitate, rezistență la antimicrobiene

1. INTRODUCERE

În prezent germenii *Proteeae* reprezintă o provocare majoră pentru clinicieni, deoarece prezintă rezistență naturală la numeroase antibiotice și o capacitate crescută de a dobândi rezistență.

Teza de doctorat abordează un subiect prioritar, întrucât emergența bacteriilor multirezistente la antibiotice a devenit o problemă de sănătate publică îngrijorătoare. Prezenta lucrare își propune să investigheze etiologia și pattern-urile de rezistență fenotipică și moleculară (identificarea beta-lactamazelor cu spectru extins și carbapenemazelor) la tulpinile din grupul *Proteeae* izolate din infecții asociate asistenței medicale (IAAM) la nivelul secțiilor de TI (terapie intensivă) și cele cu profil chirurgical. Apariția de enzime noi și metode noi de producere a vechilor enzime amenință carbapenemele (considerate antibiotice de rezervă), necesare în prezent, pentru tratamentul IAAM severe. Creșterea rapidă a rezistenței la această clasă de antibiotic a dus la limitarea drastică a opțiunilor terapeutice.

Subiectul este cu atât mai esențial, cu cât datele din literatura de specialitate sunt insuficiente atât nivel regional cât și mondial.

Rezultatele studiului aduc noutăți în completarea bazei de date de la nivel național sau european, în ceea ce privește rezistența la antibiotice prin producerea de metalo beta-lactamaze (MBL). Stabilirea unui protocol de depistare a tulpinilor producătoare de MBL are importanță majoră, atât în elaborarea ghidurilor terapeutice, cât și în recunoașterea promptă a apariției unui focar epidemic de IAAM și luarea măsurilor corespunzătoare de control al infecției.

2. PARTEA GENERALĂ

Proteeae este un grup format din trei genuri: *Proteus*, *Providencia* și *Morganella*. Taxonomia lor a prezentat numeroase modificări de-a lungul istoriei și evoluției științei microbiologice. Multă vreme clasificarea germenilor din genul *Proteus*, familia *Enterobacteriaceae* a fost discutabilă, însă pe baza proprietăților biochimice acesta a fost scindat taxonomic în anul 1997 în trei genuri: *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*(1). Însă, în 2016 aceste microorganisme oportuniste au fost clasificate, în final, ca aparținând familiei *Morganellaceae* din ordinul *Enterobacterales*(2)(3). Cele trei genuri: *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* sunt microorganisme oportuniste care au produs grade diferite de infecții comunitare și mai ales asociate asistenței medicale. Se constată o creștere a frecvenței de izolare a acestor germeni datorate creșterii numărului de pacienți imunodeprimați și a

dobândirii unor factori genetici de rezistență la antibiotice sau a unor factori de virulență care le determină condiția de patogeni oportuniști(4).

Interesul pentru acești germeni a crescut în ultimul timp, datorită emergenței infecțiilor, în special celor asociate asistenței medicale, cauzate de tulpini multirezistente (MDR), precum și faptului că acești patogeni prezintă rezistență intrinsecă la tigeciclină, colistină, nitrofurantoină și sensibilitate intrinsecă redusă la imipenem(5)(6).

Carbapenemele joacă un rol deosebit de important în lupta împotriva microorganismelor patogene. Fac parte dintr-o clasă numeroasă, cea a β -lactaminelor, acestea având spectrul cel mai larg de activitate, cu acțiune asupra bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. Sunt adesea utilizate ca „agenți de ultimă linie” sau „antibiotice de rezerva” atunci când pacienții prezintă infecții care sunt amenințătoare de viață sau atunci când se presupune că sunt determinate de organisme rezistente(7). Din păcate, creșterea dramatică a agenților patogeni MDR amenință serios această clasă de antimicrobiene. Numeroase studii recente arată foarte clar că rezistența la carbapeneme este într-o continuă creștere în întreaga lume(8)(9)(10).

Utilizarea pe scară largă a carbapenemelor, a dus la creșterea rapidă a rezistenței la această clasă, devenind o amenințare gravă pentru sănătatea globală publică. Mecanismele de rezistență includ producerea de enzime de tip carbapenemaze, pompe de eflux și mutații care duc la absența sau exprimarea redusă a două porine majore în combinație cu diverse beta-lactamaze și modificarea unor “penicillin binding proteins” (7).

Producția de carbapenemaze este mecanismul principal care stă la baza rezistenței agenților patogeni la carbapeneme la nivel global. Carbapenemazele sunt un fel de β -lactamaze care pot hidroliza aceste antimicrobiene(11).

IAAM este o problemă ascunsă, pe care nicio instituție sau țară încă nu poate să o rezolve complet. Programele de supraveghere pentru IAAM sunt prezente în mai multe țări dezvoltate, dar sunt practic absente în majoritatea celor subdezvoltate (12).

Supravegherea IAAM în TI (Terapie Intensivă) este cu atât mai necesară cu cât pacienții internați pe aceste secții prezintă un risc de 5 - 10 ori mai mare de a dobândi o infecție datorită factorilor predictivi atât intrinseci (de exemplu, imunodepresie) cât și extrinseci (de exemplu, ventilație mecanică(13).

Infecția de plagă chirurgicală (SSI) face parte din IAAM. SSIs sunt situate pe locul al doilea ca frecvență, reprezentând 10 până la 40% din totalul IAAM, după infecțiile determinate de cateterizare (14)(15). Organizația Mondială a Sănătății (WHO) estimează că la nivel mondial, 5-12% dintre pacienții spitalizați dezvoltă IAAM, dintre care mai mult de 60% sunt asociate utilizării unui dispozitiv medical sau chirurgical(16).

SSI au un impact distrugător asupra instituirii tratamentului pacientului, determinând creșterea duratei tratamentului, prelungirea timpului de spitalizare și costuri mai mari (17).

3. PARTEA SPECIALĂ

3.1. SCOP ȘI OBIECTIVE

La momentul actual, există un număr limitat de studii care analizează implicarea tulpinilor *Proteae* în IAAM sporadice sau interregionale. S-a observat identificarea tot mai crescută a germenilor cu rezistență intrinsecă la colistin (*Proteus*, *Morganella*, *Providencia*) aceasta fiind în corelație cu creșterea numărului de infecții cu CPE, ceea ce necesită o creștere a utilizării colistinului în terapie (18)(19). Infecțiile reprezintă un pericol grav în special pentru pacientul imunodeprimat, de tipul celui diabetic, astfel încât evidențierea creșterii numărului de agenți patogeni MDR, în special rezistenți la carbapeneme la acești pacienți, pune probleme deosebite în tratarea acestora(20).

Cercetarea doctorală a cuprins trei studii, care au avut drept obiective:

1. Investigarea PCR a genelor *bla*NDM, *bla*VIM, *bla*TEM și *bla*CTX-M la tulpinile selectate producătoare de carbapenemaze, cu accent pe *bla*NDM-1,
2. Caracterizarea tulpinilor încadrate în fenotipul dificil de tratat (DTR), cu identificarea factorilor care influențează achiziția lor, precum și a factorilor predictivi în ceea ce privește evoluția pacientului,
3. Impactul infecțiilor cu *Proteus mirabilis* și *Providencia stuartii* asupra pacienților diabetici.

3.2. MATERIAL ȘI METODE

Actualul proiect doctoral s-a desfășurat în cadrul "Spitalului Clinic Județean de Urgență "Pius Brînzeu" Timisoara (SCJUPBT), în perioada iulie 2017-aprilie 2019 și a cuprins pacienți spitalizați în secțiile de Terapie Intensivă și cu profil chirurgical.

Identificarea, testarea sensibilității la antibiotice și caracterizarea fenotipică a tulpinilor incluse în studiu au fost realizate în laboratorul de Microbiologie al SCJUPBT, iar confirmarea genotipică s-a realizat în laboratorul Disciplinei de Biochimie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" Timișoara.

3.2.1. În primul studiu, tulpinile bacteriene selectate au fost supuse analizei moleculare pentru identificarea genelor ce codifică carbapenemazele prin metoda PCR simplex. Au fost incluse tulpinile pe de o parte rezistente la meropenem (pentru detectarea prezenței genelor *bla*NDM, *bla*VIM) dar și cele rezistente la cefepim pentru detectarea genelor *bla*CTX-M și *bla*TEM.

3.2.2. În al doilea studiu retrospectiv au fost incluse toate tulpinile *Proteae* din prelevatele pacienților internați în secții de terapie intensivă și cu profil chirurgical fiind

folosită baza de date a primului studiu cu încadrarea tulpinilor de interes în fenotipul de rezistență denumit dificil de tratat (DTR).

3.2.3. În studiul trei au fost analizate corelația și impactul infecțiilor determinate de *P.mirabilis* și *P. stuartii* la pacienții cu diabet. Studiul a fost de observațional, retrospectiv, cross-secțional, pe o perioadă de 22 luni (2017 - 2019) și a vizat pacienții internați în secțiile de TI și cele chirurgicale ale SCJUPBT, cu includerea tuturor celor de la care s-au izolat tulpini din speciile *Proteus mirabilis* și *Providencia stuartii*.

3.3. REZULTATE

3.3.1. În Compartimentul de Bacteriologie al Laboratorului Clinic din cadrul SCJUPBT au fost prelucrate un număr de 8317 probe prelevate de la pacienții internați pe secțiile TI și secțiile cu profil chirurgical pe o perioadă de aproximativ 2 ani (iulie 2017- aprilie 2019). În acest studiu s-au identificat 400 de tulpini de *Proteeae* din care s-au conservat 65 de tulpini rezistente la carbapeneme (CRP) pentru identificarea genelor de rezistență prin metoda simplex-PCR.

Tulpinile de *Proteeae* au fost izolate cel mai frecvent din secrețiile din plagă (39,50%), aspiratele bronșice (20%), urmate de uroculturi (15,25%), hemoculturi (8,5%) și vârfurile de cateter (7%).

Cele 65 de tulpini rezistente la cel puțin un preparat din clasa carbapeneme (CRP), aparțin genurilor *Providencia* și *Proteus* cu o incidență globală de 16,25% - 6,25% pentru genul *Proteus* și 45,79% pentru genul *Providencia*. Majoritatea tulpinilor CRP au provenit de la pacienții internați pe secții TI - 86,15% (95% CI: 19,9-43,4), 63% fiind izolate în special în aspiratele bronșice (32,31%, 95% CI: 21,2-45,1) și hemoculturi (30,7%, 95% CI: 19,9-43,4).

După testarea PCR a celor 65 tulpini s-a remarcat carbapenemaza de tip MBL la 56 (86,15%; 95% CI: 75,3-93,5) dintre tulpinile CRP, având ca substrat genic predominant gena *blaNDM* la 55 tulpini (84,62%; 95% CI: 73,5-92,4). Prevalența tulpinilor CRP a fost crescută la *P. stuartii*, majoritatea tulpinilor fiind de tip MBL-*blaNDM* (61,53% din CRP), urmată de *P. mirabilis* de tip MBL-*blaNDM* (20% din CRP). La un izolat de *P. mirabilis* și unul de *P. stuartii* care din punct de vedere fenotipic au prezentat rezistență la carbapeneme, nu s-a identificat producerea de carbapenemază, iar, caracteristica tulpinii de *Providencia* a constatat în prezența genei *blaCTX-M*. S-a remarcat prezența simultană a două gene de rezistență (*blaVIM*, *blaNDM*) la un izolat de *P. stuartii*. De asemenea, merită specificat faptul că toate cele 5 izolate la care au fost depistate gene care codifică producerea de carbapenemază KPC au provenit din secția de Neurochirurgie.

Dintre tulpinile incluse în studiu 66,15% au fost rezistente la cefepim (CI 95%: 53,4-77,4), iar investigarea prin PCR a condus la identificarea prezenței genei de rezistență *blaCTX-M* la 7 (10,76%) tulpini CRP.

Letalitatea cazurilor la care s-au izolat CRP a fost de 49,23% față de 33,43% în eșantionul global ($p = 0,014$) și 22,07% în rândul celor cu tulpini sensibile la carbapeneme ($p < 0,001$).

3.3.2. Cele mai multe tulpini de *Proteae* au provenit din secrețiile de plagă (43,50%), aspiratele bronșice (20%), uroculturi (15,25%) și hemoculturi (8,5%) fiind slab reprezentate în culturile din vârf de cateter (7%), lichid peritoneal (1,75%) și spută (0,50%).

S-a remarcat dominarea numerică a speciilor *P. mirabilis* și *P. stuartii*, repartizate în mod distinctiv în prelevatele pacienților din TI și secțiile chirurgicale.

Tulpinile de *P. mirabilis* au prezentat rezistență la fluorochinolone (32,65%), fenotip ESBL (22,86%), rezistență la carbapeneme (13,06%) și aminoglicozide (12,34%). Comportamentul tulpinilor de *P. stuartii* s-a manifestat prin rezistență la fluorochinolone (85,11%), carbapeneme (75,53%), fenotip ESBL (64,98%), aminoglicozide (54,26%).

Observând rezistența la antibiotice de primă linie s-au evidențiat DTR (P-DTR) într-un procent de 21% (95% CI 17,2-25,4). La urmărirea rezistenței la antimicrobiene și încadrarea în fenotipuri de rezistență s-a constatat că 61,25% (95% CI 56,3-66,0) dintre *Proteae* au fost de tip MDR, din care 29,25% (95% CI 24,9-34,0) de tip XDR, iar 2,75% (95% CI 1,3-4,7) au fost PDR. Dintre tulpinile XDR, 71,79% au fost de tip XDR-DTR iar 28,21% XDR au prezentat sensibilitate la cel puțin o clasă din antibiotice de linia întâi. Tulpinile *Proteae*-DTR au fost în procent de 84,21%, remarcându-se speciile *P. stuartii*, *P. mirabilis*, *M. morganii* și *P. rettgeri*.

Tulpinile speciei *P. mirabilis* au fost predominant de tip MDR (51,02%), 14,28% din tulpini au fost de tip XDR și 1,63% de tip PDR. 25,71% dintre tulpini au prezentat susceptibilitate la toate antimicrobienele testate (WT) iar 9,79% s-au dovedit a fi de tip DTR. Tulpinile *P. stuartii* (N=94) au fost în proporție de 92,55% de tip MDR, 74,46% de tip XDR și 5,31% de tip PDR. 3,19% dintre tulpini au fost sensibile la toate antimicrobienele testate (WT) și 58,51% au fost încadrate în tipul DTR.

Au fost realizate două modele de regresie logistică pentru a identifica factorii de risc și de protecție ce au influențat achiziția tulpinilor incluse în fenotipul DTR.

Excesul de mortalitate în eșantionul DTR versus non-subeșantionul DTR a fost de 16,37%.

3.3.3. În perioada iulie 2017- aprilie 2019 s-au identificat 339 pacienți din secțiile cu profil TI și chirurgical, de la care s-au izolat 245 tulpini neduplicate de *Proteus mirabilis*, respectiv 94 tulpini de *Providencia stuartii*.

Din totalul pacienților diabetici internați în secțiile TI și chirurgicale, 35,77% au avut infecții cu cele două specii menționate mai sus, iar infecțiile cu tulpinile de interes la pacienții non-diabetici au fost de doar de 4,04%.

Peak-ul numărului de infecții coincide atât pentru pacienții diabetici, cât și pentru cei non-diabetici, fiind înregistrat în luna iulie 2018, existând o corelație legată de condițiile de mediu, cum ar fi temperatura ridicată.

Coeficientul de corelație Spearman între distribuția lunară a infecțiilor cu tulpinile de interes în rândul pacienților diabetici, respectiv non-diabetici a fost 0.519, semnificativ statistic ($p=0.011$).

O treime din grupul cu diabet, mai ales pacienții internați în secțiile chirurgicale, au fost infectați cu *Proteaeae*, majoritare fiind tulpini sensibile de *P. mirabilis*, spre deosebire de grupul non-diabetic, predominant în TI, cu infecții de tip IAAM, produse de tulpinile *P. stuartii* -MDR.

În rândul pacienților diabetici, cei infectați cu *Providencia stuartii* au avut o durată semnificativ mai mare a cateterizării venoase centrale, urinare, a ventilației mecanice, o proporție mai mare de rezistență bacteriană, explicabilă și prin faptul că 72.22% dintre infecții au fost IAAM. 66.67% dintre infecțiile cu *Providencia stuartii*, au fost infecții ale sângelui, în timp ce 64.00% din infecțiile cu *Proteus mirabilis* au fost infecții de plagă, 2/3 dintre ele cu caracter comunitar.

Factorii care influențează probabilitatea de deces pe timpul spitalizării, identificați prin regresia Cox, au fost: vârsta, terapia vasopresoare, specia, durata antibioterapiei, tulpinile DTR, nutriția nazo-gastrică, tulpinile ESBL, durata caterizării urinare.

3.4. CONCLUZII

3.4.1. Creșterea prevalenței a fost observată în special la *P. stuartii* și *P. mirabilis*. Cea mai frecventă carbapenemază identificată a fost NDM-1 ce furnizează bacteriilor un nivel înalt de rezistență. Răspândirea acestor izolate producătoare de carbapenemază NDM-1 atrage atenția asupra problemelor din ce în ce mai mari, constând în diseminarea rapidă în unitatile spitalicești, ridicând semne de întrebare privind importanța epidemiologică.

Aceste tulpini au prezentat diverse alte mecanisme de rezistență, fiind adesea extrem de dificil de tratat și au dus la un exces de letalitate de 27,16%. Ventilația mecanică care durează mai mult de 96 de ore, traheostomia și terapia prelungită cu antibiotice au fost cei trei factori de risc independenți identificați

3.4.2. Corelația prezenței tulpinilor DTR cu dificultăți de tratament a fost concluzionată indirect în literatura de specialitate în cercetarile efectuate asupra tulpinilor *P. stuartii* de tip MDR. *P. stuartii* prezintă un risc crescut în infecțiile asociate asistenței medicale fiind un factor de risc pentru contractarea unei infecții cu tulpina DTR, iar asocierea de proceduri invazive precum cateterismul vezical și ventilația mecanică scad în mod semnificativ șansele de supraviețuire a pacienților.

Din punct de vedere al instalării fenotipului de tip DTR, în cazul speciilor de *Proteaeae* se poate aprecia că membrii acestui grup devin agenți patogeni de tip XDR/PDR, cu implicații puternice legate de tratamentul și prognosticul pacienților, internați preponderent pe secții cu risc crescut.

3.4.3. Studiul prezintă date preliminare despre importanța patologiei infecțioase produse de speciile *Proteaeae* cu accent pe *P. stuartii* și factorii de risc implicați la pacienții diabetici, date care necesită să fie confirmate pe un grup populațional mai semnificativ și care necesită noi direcții de cercetare.

Deși pacienții diabetici au prezentat mai puțini factori de risc infecțios și rezistența tulpinilor a fost semnificativ mai redusă, supraviețuirea nu a diferit de cea a pacienților fără diabet, ceea ce atrage atenția asupra implicațiilor diabetului zaharat ca și comorbiditate. Identificarea tulpinilor *P. stuartii* de tipul DTR/ESBL au determinat o creștere de minim 2 ori a probabilității de deces, iar prezența nutriției nazo-gastrice a triplat-o.

Teza conține 25 figuri (toate, originale), 19 tabele și 217 referințe bibliografice. Pe parcursul elaborării tezei de doctorat au fost publicate 5 articole ISI (doua în calitate de autor principal și unul autor corespondent) și au fost comunicate 8 lucrări sub formă de prezentare orală sau poster la conferințe naționale și internaționale.